

(54) METHOD FOR NUCLEIC ACID DETECTION

(11) 5-236998 (A) (43) 17.5-93 (19) JP

(21) Appl. No. 4-75666 (22) 27.2.1992

(71) OLYMPUS OPTICAL CO LTD (72) KAZUO SUZUKI(1)

(51) Int. Cl<sup>s</sup>. C12Q1/68, C12N15/10, G01N33/53, G01N33/58

**PURPOSE:** To accomplish quick, easy detection of nucleic acid for diagnosing infectious diseases or genetic diseases by multiplication, using PCR technique, of detecting marker nucleotide and solidifying marker nucleotide followed by solidification with the latter marker to effect separation and then by detection with the former marker.

**CONSTITUTION:** A biological specimen having a nucleotide sequence composed of two complementary strands independent of each other is treated using two kinds of primers under such conditions that the respective primers are bound to the respective nucleotide sequences; with these nucleotide strands as template strands, nucleotides including detectably modified nucleotide and separably modified nucleotide are taken in to extend primer strand, which is then made to get out of contact with the template; this operation is repeated to effect multiplication. Thence, the extended product is bound to a solid phase substrate bearing a ligand and separated, and the quantity of the detectably modified nucleotides in the extended product is determined, thus accomplishing detection of the targeted nucleotide sequence in the biological specimen.

(54) METHOD FOR DETECTING AND MEASURING NUCLEIC ACID

(11) 5-237000 (A) (43) 17.9.1993 (19) JP

(21) Appl. No. 3-313616 (22) 31.10.1991 (33) JP

(71) TOSOH CORP (72) YOSHITAMI MITOMA

(51) Int. Cl<sup>s</sup>. C12Q1/68,C12N15/10//C12Q1/48

(34) MM 34.1.012Q1/00,01EN15/10//012Q1/48

**PURPOSE:** To solve problems in mixing of an amplified nucleic acid in other samples and determine nucleic acid in a sample by utilizing polymerase chain reaction in a method for detecting the nucleic acid utilizing the polymerase chain reaction.

**CONSTITUTION:** A specific nucleic acid region of the target nucleic acid is amplified by polymerase chain reaction and a fluorescent coloring matter changing fluorescent characteristics by reaction with the specific nucleic acid region is made to react with the amplified nucleic acid region. The fluorescent intensity is then measured to detect the target nucleic acid.

(54) BOOT

(11) 5-237001 (A) (43) 1791993 (19) 1P

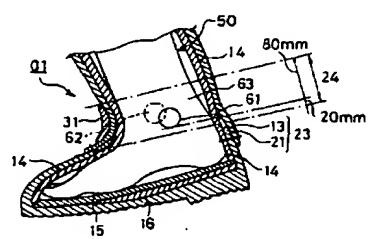
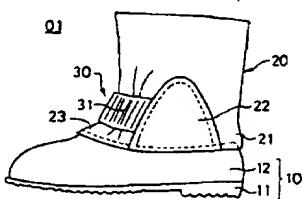
(21) Appl. No. 4-75873 (22) 28.2.1992

(71) ACHILLES CORP(1) (72) HIROHICO KUBOTA

(4) ACHILLES CORP(1) (72) H  
(51) Int. Cl<sup>5</sup>: A43B3/02 A43B23/02

**PURPOSE:** To obtain the title boot which facilitates putting-on, is integrally in close contact with the foot and is excellent in stability, and from it the foot is not removed even in running as well as in walking, and in its wearing state, a person can move actively without fear that the person takes a false step or has a fall in walking or running.

**CONSTITUTION:** The title boot is composed as follows, that is, on each side of a leg member 20, a holding part 22 formed in the shape of a round mountain-like flat plate, is separately raised from the bottoms of the leg member 20, each end of an elastically fastening member 31 is held between the holding part 22 and the leg member 20 and is sewed together, and a top hem 13 on an upper 12 of a foot member 10 is inserted into a bottom hem 21 on the leg member 20, and finally they are overlapped each other and are sewed. In addition, the position of the elastically fastening member 31 is set within a width 24 of the band of the fastening member, which is 20mm downward and 80mm upward in maximum width, starting from the lower end of the part opposed to an outer ankle 61.



(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-237000

(43)公開日 平成5年(1993)9月17日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

C 12 Q 1/68

C 12 N 15/10

// C 12 Q 1/48

識別記号 庁内整理番号

Z NA Z 8114-4B

Z 6807-4B

8931-4B

F I

C 12 N 15/ 00

技術表示箇所

A

審査請求 未請求 請求項の数 5(全 7 頁)

(21)出願番号

特願平3-313616

(22)出願日

平成3年(1991)10月31日

(31)優先権主張番号

特願平2-294305

(32)優先日

平2(1990)10月31日

(33)優先権主張国

日本 (JP)

(71)出願人 000003300

東ソー株式会社

山口県新南陽市開成町4560番地

(72)発明者 三苦 恵民

神奈川県藤沢市湘南台 4-26- 5

(74)代理人 弁理士 谷川 英次郎

(54)【発明の名称】 核酸の検出及び測定方法

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 ポリメラーゼチェーンリアクションを利用した核酸の検出方法において、増幅された核酸が他の試料に混入する問題を解決した方法を提供すること及びポリメラーゼチェーンリアクションを利用して試料中の核酸を定量できる方法を提供すること。

【構成】 標的核酸の特定核酸領域をポリメラーゼチェーンリアクションにより増幅し、前記特定核酸領域と反応することにより蛍光特性が変化する蛍光色素を前記増幅された核酸領域と反応させた後、蛍光強度を測定することにより標的核酸を検出することを特徴とする核酸検出方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 標的核酸の特定核酸領域をポリメラーゼチエーンリアクションにより増幅し、前記特定核酸領域と反応することにより蛍光特性が変化する蛍光色素を前記増幅された核酸領域と反応させた後、蛍光強度を測定することにより標的核酸を検出することを特徴とする核酸検出方法。

【請求項2】 標的核酸の特定核酸領域と反応することにより蛍光特性が変化する蛍光色素の存在下、前記特定核酸領域をポリメラーゼチエーンリアクションにより増幅し、ポリメラーゼチエーンリアクション前後の蛍光強度を測定することにより前記標的核酸の検出を行うことを特徴とする核酸検出方法。

【請求項3】 標的核酸の特定核酸領域と反応することにより蛍光特性が変化する蛍光色素の存在下、前記特定核酸領域をポリメラーゼチエーンリアクションにより増幅し、ポリメラーゼチエーンリアクション過程における蛍光強度を測定することにより前記標的核酸の初期量の相対比較又は定量を行なうことを特徴とする核酸の測定方法。

【請求項4】 前記蛍光色素はインターラーカーラー性蛍光色素であることを特徴とする請求項1ないし3のいずれか1項記載の核酸検出方法。

【請求項5】 前記特定核酸領域の増幅及び前記蛍光強度の測定は密閉された状態で行われることを特徴とする請求項1ないし4のいずれか1項に記載の核酸検出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、特定核酸領域を有する核酸を検出又は測定する方法に係り、特に、特定核酸領域をポリメラーゼチエーンリアクションにより増幅し、この増幅された特定核酸領域を検出又は測定することにより標的核酸の検出又は測定を行う核酸検出方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 従来より、ウイルス、細菌等による感染症の臨床検査等の分野においては、組織、体液、便等の生体関連の検体の培養を行い、病原体の同定を行うことが行われている。しかしながら、このような方法は、検体の培養に長時間を要し、又検体の培養自体が困難な場合もあり、必ずしも満足のいく結果が得られるものではない。また、検体の培養に際して、実施者に病原体が感染する危険性もある。

【0003】 また、迅速に病原体の同定を行う方法として、抗原抗体反応を利用した抗原検出方法又はDNAプローブによる核酸の検出方法も行われている。しかしながら、抗原抗体反応を利用した抗原検出方法においては、病原体の抗原部分が隠蔽されているような場合には、病原体を検出できないおそれがある。また、細菌等

においては非常に多くの抗原部分を有する場合があり、特定の細菌種に固有な特定共通抗原部分を見い出すことは必ずしも容易でない。また、検出にはある程度の数又は濃度の細菌又は細胞が必要であり、細胞数等が不足することにより病原体を検出できない場合があり、感度的にも問題がある。

【0004】 これに対して、DNAプローブによる核酸検出方法においては、細菌種固有の核酸領域を見い出すことは比較的容易で、この核酸領域をクローニングし又

10 合成することにより、核酸プローブとして用いることができるといった利点がある。また、近年ポリメラーゼチエーンリアクション(SCIENCE, 230, 1350-1354, 1985)なる核酸増幅方法が報告されている。このポリメラーゼチエーンリアクションは核酸分子中の特定核酸領域を試験管内で100万倍にも増幅するものである。このポリメラーゼチエーンリアクションを利用することにより標的核酸の特定核酸領域を増幅された状態で検出することが可能となり、感度的には1分子の核酸から病原体を検出することも可能となっている。そして、この増幅された特定核酸領域の一般的な検出方法としては、ポリメラーゼチエーンリアクション終了後の反応溶液をアガロース電気泳動により分離した後染色し、バンドの大きさ(分子量)で判別する方法や、前記反応溶液をドットハイブリダイゼーション法により検出する方法が行われている。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、このポリメラーゼチエーンリアクションを利用した核酸検出方法においては、一旦、ポリメラーゼチエーンリアクション終了後の反応溶液を反応容器から取り出して処理するものであるため、増幅された特定核酸領域が環境中に飛散し、この飛散した特定核酸領域が実験室内的他の検体に混入することにより、この核酸が次のポリメラーゼチエーンリアクションの錆型核酸となり、他の検体の検査において偽陽性の原因となるおそれがあり、ポリメラーゼチエーンリアクションを利用した核酸検出方法を実施するにあたって大きな障害となっている。また、ポリメラーゼチエーンリアクションの欠点として、試料中の標的核酸の初期濃度がわかりにくいという問題もある。

30 40 【0006】 本発明は以上のような問題点に鑑み創案されたものであり、ポリメラーゼチエーンリアクションにより標的核酸の特定核酸領域を増幅した後、密封したままの状態で核酸の検出又は定量を行うことが可能な核酸検出方法を提供することを目的とする。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】 本願発明者はポリメラーゼチエーンリアクションを利用した核酸検出方法について鋭意研究を行った結果、標的核酸の特定核酸領域と結合することにより蛍光特性が変化する蛍光色素と、ポリメラーゼチエーンリアクションにより増幅された核酸配

列を反応させ、蛍光強度を測定することにより、標的核酸の有無を判別できることを見い出し本発明を完成了。さらに、本願発明者は、前記蛍光色素の存在下でポリメラーゼチーンリアクションを行ない、ポリメラーゼチーンリアクション過程における蛍光強度の変化を追跡したところ、あるサイクル数を経た時点で蛍光強度が急激に変化し、かつ、この急激に変化する時点が標的核酸の初期濃度に依存して変化することを見出し、この現象を利用して試料中の標的核酸の定量又は初期量の比較を行なうことができることを見い出し本発明を完成了。

【0008】即ち、本発明は、(1) 標的核酸の特定核酸領域をポリメラーゼチーンリアクションにより増幅し、前記特定核酸領域と反応することにより蛍光強度が変化する蛍光色素を前記増幅された核酸領域と反応させた後、蛍光強度を測定することにより標的核酸を検出することを特徴とする核酸検出方法、(2) 標的核酸の特定核酸領域と反応することにより蛍光強度が変化する蛍光色素の存在下、前記特定核酸領域をポリメラーゼチーンリアクションにより増幅し、ポリメラーゼチーンリアクション前後の蛍光強度を測定することにより前記標的核酸の検出を行うことを特徴とする核酸検出方法、及び(3) 標的核酸の特定核酸領域と反応することにより蛍光特性が変化する蛍光色素の存在下、前記特定核酸領域をポリメラーゼチーンリアクションにより増幅し、ポリメラーゼチーンリアクション過程における蛍光強度を測定することにより前記標的核酸の初期量の相対比較又は定量を行なうことを特徴とする核酸の測定方法を提供するものである。

【0009】本発明の原理は、例えばインターラーカレータ一性蛍光色素等の蛍光色素が水溶液中で遊離した状態と2本鎖核酸と結合(インターラート)した状態とでは、その蛍光特性が著しく変化することを利用する。即ち、ポリメラーゼチーンリアクション前の検体を含む溶液には極微量の雑型となる核酸、最低1組の一本鎖合成DNA(プライマー)、酵素及びモノヌクレオチド三磷酸等が含まれており、これらの成分は蛍光色素に一定の蛍光特性を与える。しかしながら、仮に、標的となる核酸が含まれておらず特定核酸領域の増幅が起こらなかつた場合、ポリメラーゼチーンリアクション前後で蛍光特性はそれほど変化しない。一方、標的核酸が含まれている場合、ポリメラーゼチーンリアクションにより特定核酸領域が増幅され、この増幅された二本鎖核酸は蛍光色素と結合して相対的に蛍光特性が変化する。従つて、ポリメラーゼチーンリアクション前後の蛍光特性の変化を調べることにより標的核酸の有無を検出することが可能になる。

【0010】また、本発明においては、標的核酸を含まない検体を用いて陰性対象実験を行い、結果を比較することにより、核酸の有無を検出ことも可能である。この

場合、標的核酸が極微量(ナノグラム以下)であることが好ましい。

【0011】蛍光色素は、密封検出という見地からポリメラーゼチーンリアクション前に予め加えられていることが好ましいが、ポリメラーゼチーンリアクションの後から加えることも可能である。この場合は陰性対照実験を行なうことが好ましい。このように、蛍光色素をポリメラーゼチーンリアクションの後から加える場合であっても、従来法のように増幅後の試料を容器から取り出して分析するということがないので、コンタミネーションの可能性は従来法に比べてはるかに低くなる。さらに、ポリメラーゼチーンリアクションにより増幅された標的核酸と上記蛍光色素を反応させた後、さらにポリメラーゼチーンリアクションを行なうことも可能である(この場合、ポリメラーゼチーンリアクションの途中で蛍光色素を加えることになる)。

【0012】また、蛍光色素をポリメラーゼチーンリアクションの前に加えておき、ポリメラーゼチーンリアクション過程における蛍光強度をモニターすることにより試料中の標的核酸の初期量を定量し又は比較することが可能になる。すなわち、後述の実施例において明らかになるように、ポリメラーゼチーンリアクション過程における蛍光強度の変化を追跡したところ、あるサイクル数を経た時点で蛍光強度が急激に変化し、かつ、この急激に変化する時点が標的核酸の初期濃度に依存して変化することを見出した。すなわち、試料中の標的核酸の初期濃度が高ければより早いサイクル数にて蛍光強度の急激な変化が起き、一方、初期濃度が低い場合にはその分遅いサイクル数にて蛍光強度の変化が起きる。従つて、濃度既知の試料を用いて予めサイクル数と蛍光強度の関係を求めた検量線を作成しておけば、濃度未知の試料においても標的核酸の初期量を定量することが可能になる。また、標的核酸の初期量の単なる比較であれば検量線を作成しなくても可能である。

【0013】本発明の方法に用いる蛍光色素としては、核酸に対するインターラーカレータ一性蛍光色素が好ましい。核酸に対するインターラーカレータ一性蛍光色素としては既に多くの化合物が報告されており、本発明に用いられるインターラーカレータ一性蛍光色素は特に限定されるものではない。しかしながら、ポリメラーゼチーンリアクションにおいては、その反応溶液中にタンパク質が含まれるため、蛍光物質としては水溶性で、かつタンパク質の影響を受けにくいものが好ましい。また、ポリメラーゼチーンリアクションにおいては室温から高温への温度変化を繰り返し行うため熱的にも安定なものが好ましい。具体的には、

(1) エチジュームプロマイド及びその誘導体(例えばBiochemistry 27, 7919 (1988); J. Cell Biol. 59, 766 (1973); Biochemistry 17, 5078 (1978)及びBiochemistry 22, 3231 (1983)に記載のもの)

(2) アクリジンオレンジ及びその誘導体（例えばCytometry 9, 325 (1988); Proc. Natl. Acad. sci. 72, 2915 (1975) 及び Biochemistry 17, 5071 (1978) に記載のもの）

(3) ピスベンチミド及びその誘導体（例えばExp. Cell Res. 174, 388 (1988); Cold Harbor Symposia on Quant. Biol. 51, 151 (1986) 及びNucleic Acids Res. 15, 10589 (1987) 記載のもの）

(4) ジアミノフェニルインドール及びその誘導体（例えばPlant Sci. 55, 151 (1988) 及びProc. Natl Acad. sci 83, 2934 (1986) 記載のもの）

(5) アクチノマイシン及びその誘導体（例えばCytometry 1, 2 (1980) 及びHistochem. 72, 11 (1981) 記載のもの）

(6) チアゾールオレンジ及びその誘導体（例えばCytometry 7, 508 (1986); Cytometry 8, 568 (1987) 及び日本感光色素社カタログNK-321, NK-731等に記載のもの）

(7) クロモマイシン及びその誘導体（例えばAntibiot. Chemother. 12, 182 (1962) 及びAnticancer Research, 1, 341 (1981) に記載のもの）

等を用いることが好ましい。

【0014】上述のように、インターラーカレーター性蛍光色素を用いる場合、インターラーカレーター性蛍光色素が水溶液中で遊離した状態と、2本鎖核酸中にインターラーカレートした状態で蛍光特性が変化することを利用する。この蛍光特性の変化は実際的には蛍光強度の変化として捉えることができるが、本質的には蛍光スペクトルの変化に由来している。この蛍光スペクトルの変化は次の4つの場合に分類される。すなわち、2本鎖DNA存在下あるいは非存在下での励起光スペクトル、放射光スペクトルのそれぞれの最大波長を比較した場合、

(1) 励起光スペクトルのピーク波長及び放射光スペクトルのピーク波長共に変化しない（すなわち、この場合には蛍光強度のみが変化する）

(2) 励起光スペクトルのピーク波長は変化するが放射光スペクトルのピーク波長は変化しない。

(3) 励起光スペクトルのピーク波長は変化しないが放射光スペクトルのピーク波長が変化する。

(4) 励起光、放射光スペクトルのピーク波長が共に変化する。

【0015】アクリジンオレンジ等は励起光スペクトルのピーク波長が数nm変化しているが(1)の例として挙げることができる。またピスベンチミド等（例えば後述の実施例で用いるヘキスト33258等）は(3)のケースに近いといえる。また多くのインターラーカレーター性蛍光色素は(4)のケースに含まれる（厳密に言えばアクリジンオレンジ、ヘキスト33258も(4)に入る）

【0016】従って、ポリメラーゼチエーンリアクション前後あるいは過程の蛍光スペクトルをとることによつても増幅の判定を行なうことは可能である。しかし、一

般的には2本鎖DNAの存在下での至適条件にて（励起光スペクトルのピーク波長近辺で励起し、放射光スペクトルのピーク波長近辺で測定する）蛍光強度の変化を測定することで核酸の増幅を検出又は測定することが簡便で好ましい。

【0017】また、反応溶液に添加するインターラーカレーター性蛍光物質の量は、ポリメラーゼチエーンリアクションにより、最終的に生成するであろう二本鎖核酸の数塩基対ないし100塩基対当りに1分子の蛍光色素が結合する程度の量が好ましい。

【0018】蛍光強度を測定する方法としては、従来から行われている蛍光光度計により数値的に測定する方法が好ましい。しかしながら、結果を定性的に判別するだけであれば肉眼、写真等により蛍光の濃淡を判別する方法も用いることができる。本発明に係る核酸の検出方法においては、特定核酸領域の検出を行う際、密封した状態で行なうことが望ましいので、ポリメラーゼチエーンリアクションを行なった容器を密封したままの状態でそのまま蛍光光度計に適用することが好ましい。従って、ポリメラーゼチエーンリアクションを行う反応容器は蛍光色素の励起光を通し、耐熱性に優れかつタンパク質の吸着が少ない材料で成形されていることが好ましく、具体的には、ポリプロピレン樹脂、シリコンコートされたガラス、ポリメチルベンテン樹脂等の材料で成形された容器を用いることが好ましい。

【0019】  
【発明の効果】本発明によれば、ポリメラーゼチエーンリアクションを利用した核酸の検出又は測定を密封した状態で行なうことができるため、従来問題となっていたポリメラーゼチエーンリアクションにより増幅された特定核酸領域が環境中へ飛散し、これが他の検体に混入するといった問題を克服できる。また、本発明は、従来から用いられてきたポリメラーゼチエーンリアクション反応溶液に微量の蛍光色素を添加するだけなので、操作が簡単であり、技術的な熟練を必要としない。従って、検体の大量処理が可能であり、ポリメラーゼチエーンリアクションを用いたスクリーニング等にも適用が可能となる。また、特定核酸領域の増幅が起こったか否かを数値的に判断できるため、操作の自動化も容易である。

【0020】  
【実施例】以下、本発明の実施例を説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0021】実施例1

宝酒造製DNAキット(Gene Amp<sup>TM</sup>)を用いてポリメラーゼチエーンリアクション法による核酸の増幅を行なった。ポリメラーゼチエーンリアクションを行う反応溶液はキット添付の検定用λDNA及び1組のプライマーを用いて、キット添付のプロトコールに従って調製した。この反応溶液にインターラーカレーター性蛍光色素としてヘキスト33258色素を最終濃度1μg/mlになるよ

うに添加した。そして、変性 (94°C、1分)、アニーリング (37°C、1分)、Taqポリメラーゼによる

\* DNAの伸張 (72°C、1分) のサイクルを30サイクル行った。反応溶液の組成は以下の通りである。

## 反応溶液の組成

λ DNA (0.1 μg/ml)	10 μl
10 x 反応緩衝液	10 μl
Hoechst33258 (10 μg/ml)	10 μl
プライマー1及びプライマー2 (20 μM)	各5 μl
dNTP混合物 (各2.5 mM)	8 μl
H <sub>2</sub> O	51.5 μl
Taq ポリメラーゼ (5単位/μl)	0.5 μl

上記の10 x 反応緩衝液の組成は以下の通りである。

10 x 反応緩衝液	
塩化カリウム	0.5M
トリス-塩酸緩衝液 (pH8.3)	0.1M
塩化マグネシウム	15mM
ゼラチン	0.01% (w/v)

使用したプライマー1及び2の塩基配列は以下の通りである。

## プライマーの塩基配列

プライマー1: λ DNAの7131-7155 (一鎖に相補的)

GATGAGTTCTGTCCGTACAATGG

プライマー2: λ DNAの7606-7630 (+鎖に相補的)

GGTTATCGAAATCAGGCCACAGCGCC

【0022】ポリメラーゼチェーンリアクション終了後、反応容器を密封した状態で、蛍光分光光度計 (日立850型) を用いて、励起343nm、発光483nm (PMゲイン: High、応答: 2秒、EMフィルター: 350nm) にて蛍光強度を測定した。

【0023】また、陰性対照実験として、λ DNAを添加しなかった他は上述の反応溶液と同一組成の反応溶液を用い、同一条件でポリメラーゼチェーンリアクションと蛍光強度の測定を行った。

【0024】その結果、陰性対照区では蛍光強度が275であるのに対し、陽性対照区では蛍光強度が1260であり、明らかに差異が認められた。

【0025】さらに、ポリメラーゼチェーンリアクション終了後の反応溶液の一部を1%アガロースゲル (トリス、ホウ酸、EDTAを含む緩衝液系) に供し、室温で30分、100Vの条件下で電気泳動にかけたところ、図1に示されるような電気泳動図が得られた。なお、図1中、レーン1は分子量マーカーの泳動パターン、レーン2はポリメラーゼチェーンリアクションでDNAを増幅した陽性対照区の電気泳動パターン、レーン3は陰性対照区の電気泳動パターンを示す。この電気泳動図からも陽性対照区でλ DNAの特定核酸領域の増幅が起こっていることが確認された。以上の結果から本発明の効果は明らかであった。

## 【0026】実施例2

実施例1と同一条件でポリメラーゼチェーンリアクションの反応溶液を調製し、陽性対照区と陰性対照区の各々※50

※について、ポリメラーゼチェーンリアクションを行う前と、ポリメラーゼチェーンリアクションの終了後、それぞれ密封した状態で蛍光強度を測定した。尚、蛍光強度の測定も実施例1と同一の条件により行った。

## 【0027】結果は以下の通りである。

## 蛍光強度

	PCR前	PCR終了後
陰性対照区	233	270
陽性対照区	205	1170

20 PCR: ポリメラーゼチェーンリアクション

【0028】陰性対照区においてもポリメラーゼチェーンリアクションにより若干の蛍光強度の増加が認められるが、その増加率は1.2倍である。これに対し、陽性対照区においては、蛍光強度の増加率は5.7倍であり、明らかに差異が認められた。以上の結果からも本発明の効果は明らかであった。

## 【0029】実施例3 (細菌由来の染色体DNAの検出)

Mycobacterium smegmatis をDubosの培地で5日間培養した後、菌体を遠心分離により収集し、そのうち100mgを標準菌体とした。この標準菌体を下記の組成を有する緩衝液0.5mlに懸濁し、これに0.1mlの20%ドデシル硫酸ナトリウムを加え、等量のフェノール/クロロフォルム混合溶液 (1:1) を加え激しく混和した後、60°Cで10分間静定した。

【0030】この溶液を遠心分離にかけ水相を分離し、この水相に2.5倍量のエタノールを加え、-80°Cで30分静定した後、遠心分離により核酸を沈殿させた。この沈殿を70%エタノールで洗浄し、真空中で乾燥させた後、100μlのTE緩衝液に溶解し、検定用DNAとした。尚、上記緩衝液の組成は以下の通りである。

## 緩衝液の組成

塩化ナトリウム	100mM
トリス-塩酸緩衝液	10mM
EDTA	1mM
pH 7.5	

【0031】この検定用DNAについてポリメラーゼチェーンリアクションを行い、染色体上の16S rRNA遺伝子の増幅を行った。そして、ポリメラーゼチェーン

リアクションを行う前とポリメラーゼチェーンリアクションの終了後、それぞれ密閉した状態で蛍光強度の測定を行った。尚、ポリメラーゼチェーンリアクションの反応溶液の組成は以下のとおりである。

反応溶液の組成

検定用DNA	1 $\mu$ l
10 x 反応緩衝液	10 $\mu$ l
Hechst33258(10 $\mu$ g/ml)	10 $\mu$ l
プライマー1	5 $\mu$ l
プライマー2	5 $\mu$ l
dNTP混合物 (2.5 mMずつ)	8 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	60.5 $\mu$ l
<u>Taq</u> ポリメラーゼ	0.5 $\mu$ l

プライマー1及び2の塩基配列は以下のとおりである。

プライマーの塩基配列

プライマー1 5' TAACACATGCAAGTCGAACGG3'

プライマー2 5' AACTGAGACCGGCTTTAAGGATT3'

ポリメラーゼチェーンリアクション及び蛍光強度の測定は実施例1と同一方法により行った。

【0032】その結果、ポリメラーゼチェーンリアクション前では蛍光強度が530であるのに対し、ポリメラーゼチェーンリアクション終了後では蛍光強度が902であり、約1.7倍の蛍光強度の増加が認められ、DNAの特定領域の増幅を通してDNAの存在が確認された。以上の結果からも本発明の効果は明らかであった。

【0033】実施例4

実施例1と同じようにポリメラーゼチェーンリアクションの反応溶液600  $\mu$ lを調製し(ただし錆型となるDNAの濃度は実施例1の10分の1濃度)、各50  $\mu$ lづつに12等分し、マイクロチューブに分注した。ポリメラーゼチェーンリアクションの各濃度条件は変性(94℃, 30秒)、アニーリング(45℃, 20秒)、Taq ポリメラーゼによるDNAの伸長(72℃, 1分)で25サイクル行った。0, 9, 12, 14, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 25サイクル目で各チューブを取り出し、72℃に温度調節\*

\*されたホルダーをセットされた蛍光検出器(自作、励起光350nm、エミッション450nm)で測定した。

図2はサイクル数を横軸に相対蛍光強度を縦軸にプロットしたものである。これらの結果から蛍光強度を測定することでポリメラーゼチェーンリアクションの過程を密封した状態でモニターできることが確認された。これらの結果からも本発明の効果は明らかであった。

【0034】実施例5

実施例1と同じように錆型濃度の異なる3種類のポリメラーゼチェーンリアクションの反応溶液300  $\mu$ lを調製し(但し、各プライマー濃度は1/5濃度とした。また錆型DNAは100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/mlの3種類とした)、これを12等分し各25  $\mu$ lづつチューブに分注し、変性(94℃, 1分)、アニーリング(37℃, 1分)、伸長反応(72℃, 1分)の条件でポリメラーゼチェーンリアクション26サイクル行った。これらを実施例4と同様に0, 5, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26サイクル目にそれぞれ各チューブを取り出し、室温にて各チューブの相対蛍光強度を測定した。それぞれの結果を同一グラフ上にプロットしたものが図3である。これらの結果から明らかのように、錆型DNAの初期濃度が高いものほど、早い時期に蛍光が増大し始めることが判る。このことからポリメラーゼチェーンリアクションの過程をモニターすることにより、試料中に含まれる目的核酸の量を比較が可能であることが確認された。以上の結果からも本発明の効果は明らかである。

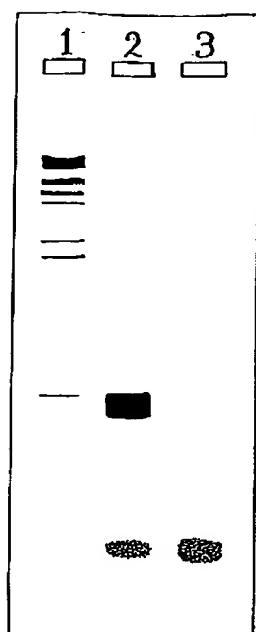
【図面の簡単な説明】

【図1】ポリメラーゼチェーンリアクション終了後の反応溶液の電気泳動図の模式図。

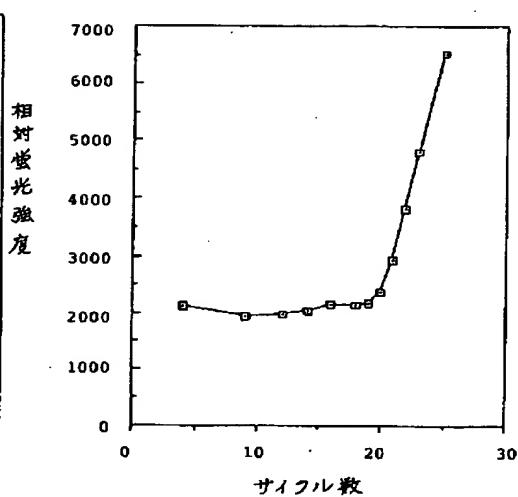
【図2】ポリメラーゼチェーンリアクションのサイクル数と相対蛍光強度との関係を示す図。

【図3】異なる濃度の錆型DNAを含む3種類の試料を試験した場合における、ポリメラーゼチェーンリアクションのサイクル数と相対蛍光強度との関係を示す図。

【図1】



【図2】



【図3】

